

THESIS

MUNICH

1968

**Der Einfluß von Furosemid
und Äthacrynsäure
auf Potentialdifferenz
und Kurzschlußstrom der
isolierten Amphibienhaut**

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

HELMUT L CARL



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154017_0173

Dissertations- und Fotodruck Franz Frank
8 München 13, Zieblandstr. 39, Tel. 597 397

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. Schwiegk

Der Einfluß von Furosemid und Äthacrynsäure
auf Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom
der isolierten Amphibienhaut

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

H e l m u t C a r l

aus Hannover

München 1968

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Schwiegl

Dekan: Prof. Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 7. 5. 1968

Herrn Prof. Dr. med. E. BUCHBORN danke ich für die Überlassung des Themas.

Ebenso bin ich Herrn Prof. Dr.med. H. SCHWIEGK für die Übernahme des Correferates dankbar.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Oberarzt Dr. med. J.EIGLER für seine wertvolle Unterstützung und für wichtige Literaturhinweise.

Auch den Mitarbeitern des Münchner Labors von Prof. Dr. Buchborn sei für ihre Assistenz herzlich gedankt.

I n h a l t

Einleitung	Seite 1 - 2
Literaturübersicht	
A Ionenbewegungen an epithelialen Membranen und Prinzip der Methode	2 - 8
B Furosemid (Lasix ^R)	8 - 11
C Äthacrynsäure (Hydromedin ^R)	11 - 15
Zusammenfassung und Problemstellung	15
Methodik	15 - 20
Ergebnisse	
1. Kontrollversuche	20 - 22
2. Die Wirkung von Salyrgan ^R	22 - 26
3. Die Wirkung von Furosemid	26 - 30
4. Die Wirkung von Äthacrynsäure	30 - 33
Diskussion	33 - 39
Zusammenfassung	39 - 40
Literaturverzeichnis	41 - 47
Anhang: Lebenslauf	

Einleitung

Unter den neueren Diuretika haben die Äthacrynsäure und das Furosemid wegen ihrer großen Wirksamkeit besondere Bedeutung erlangt. Auf Grund der von diesen Substanzen bekannten Eigenschaften ist anzunehmen, daß sie einen starken Einfluß auf aktive Transportvorgänge und möglicherweise auch auf Permeabilitätsverhältnisse an transportaktiven zellulären Grenzflächen ausüben.

Für die Analyse derartiger Transportvorgänge hat sich das Präparat der isolierten Amphibienhaut sehr gut bewährt; insbesondere, seitdem gezeigt werden konnte, daß der sogenannte "Kurzschlußstrom" ein Maß für den aktiven Natriumnettotransport durch die Membran darstellt. Um einige in diesem Zusammenhang auftretende Probleme zu klären, wurden in der vorliegenden Arbeit die genannten Substanzen und vergleichshalber Salyrgan^R an der isolierten Bauchhaut der Erdkröte in ihrem Einfluß auf Membranpotential und Kurzschlußstrom geprüft.

Im Verlauf der hier mitgeteilten Untersuchungen stellte sich heraus, daß sowohl Furosemid als auch Äthacrynsäure einen deutlichen Einfluß auf Membranpotential und Kurzschlußstrom der isolierten Haut ausüben. Die Substanzen wirken jedoch in unterschiedlicher Weise, je nachdem, ob sie auf der Innen- oder Außenseite der Membran zugegeben werden. Die Ergebnisse zeigen, daß beide Substanzen nicht nur den aktiven Natriumtransport, sondern offenbar auch die

Permeabilitätsverhältnisse für passiv diffundierende Ionen beeinflussen. Es wird auf Grund dieser Befunde versucht, bestimmte bei der klinischen Anwendung und im Tierexperiment beobachtete Wirkungscharakteristika im Hinblick auf ihre Membraneigenschaften zu interpretieren. ¹⁾

L i t e r a t u r ü b e r s i c h t

A Ionenbewegungen an epithelialen Membranen und Prinzip der Methode

Die in Ringerlösung getauchte isolierte Amphibienhaut vermag über Stunden eine Potentialdifferenz aufrechtzuerhalten, wobei die Innenseite gegenüber der Außenseite positiv ist. Diese Beobachtung wurde von DU BOIS REYMOND (1848) an einer isolierten Froschhaut zum ersten Mal gemacht. GALEOTTI (1904) studierte das gleiche Phänomen und fand , daß das Potential nur dann vorhanden war, wenn die Ringerlösung Natrium- oder Lithiumionen enthielt . Seine Beobachtungen gerieten jedoch in Vergessenheit. Später wurden viele Theorien über die Ursache dieses Potentials veröffentlicht: z.B. UHLENBROCK (1925), MOTOKAWA (1935) und MEYER (1946).

1935 konnte HUF an isolierten Froschhäuten nachweisen, daß Natriumchlorid von außen nach innen trans-

1) Die Experimente wurden in der Zeit von Jan. bis Aug. 1965 durchgeführt . Bei der Abfassung des Manuskriptes wurde die entsprechende Literatur bis einschließlich des Erscheinungsjahres 1965 berücksichtigt.

portiert wird. Da die Konzentrationen auf beiden Seiten anfangs gleich waren, folgte HUF, daß ein aktiver Transport stattfindet. 1949 zeigte USSING, daß die Bewegung einer der beiden Ionenarten aktiv ist. Weiterhin diskutierte er, ob der angenommene aktive Transport von Natriumionen die Potentialdifferenz der Haut bewirke. Er vermutete, daß die Chlorionen dann entsprechend ihrem elektro-chemischen Gradienten nachdiffundieren würden. KOEFOED-JOHNSON (1951) konnte nachweisen, daß die Transportraten für Chlorionen den jeweiligen Konzentrationsunterschieden zwischen innen und außen entsprachen. Dies wies eindeutig auf eine passive Bewegung der Chlorionen hin.

1951 entwickelte USSING gemeinsam mit ZERAHN eine Versuchsanordnung, durch die eine für die Physiologie des aktiven Transportes grundlegende Erkenntnis gewonnen werden konnte: Es wurde mittels eines Stromes über zwei äußere Elektroden das Potential einer isolierten Froschhaut, die in Ringerlösung eintauchte, bis auf Null kompensiert. Da dabei prinzipiell ein Kurzschluß erzeugt wird, bezeichnet man den fließenden Strom als sogenannten "Kurzschlußstrom". Wird auf diese Weise das Potential eliminiert, so befindet sich die Membran in einem Zustand, der eine passive epitheliale Nettobewegung unmöglich macht, da alle dafür notwendigen Gradienten (elektrisch, chemisch, thermisch, hydrostatisch)

fehlen. Jede unter diesen Bedingungen beobachtete Nettobewegung von Ionen muß daher Ausdruck aktiver Transportvorgänge sein.

Durch Verwendung von radioaktiv markiertem Natrium (Na^{22} und Na^{24}) für die innere bzw. äußere Badlösung haben USSING und ZERAHN deshalb an der kurzgeschlossenen Membran den Natriuminflux und -efflux gemessen. Dabei haben sie festgestellt, daß ein Natriumnettotransport von außen nach innen stattfindet, der in seiner Größe dem während der gleichen Zeit gemessenen Kurzschlußstrom entspricht; ²⁾d.h., daß unter diesen experimentellen Bedingungen der sogenannte Kurzschlußstrom ein direktes und quantitativ zuverlässiges Maß für den aktiven Natriumnettotransport darstellt.

Die Identität zwischen Kurzschlußstrom und trans-epithelialer Natriumnettobewegung wurde inzwischen auch unter dem Einfluß transportsteigernder oder hemmender Pharmaka vielfach bestätigt. Eine wichtige Ausnahme bildet allerdings Adrenalin, für dessen Einwirkung die oben genannte Beziehung keine volle Gültigkeit besitzt, wahrscheinlich, weil durch das Pharmakon Drüsenepithel der Haut zu einer aktiven Sekretion von Chlorionen angeregt wird.

Als Ursache für die beobachtete spontane Membranspannung der isolierten Amphibienhaut ist also der aktive Transport von Natriumionen anzusehen, wobei

2) 1 Mikroval Natrium / sec. = $9,6 \cdot 10^4$ Mikroampère

die Höhe des Potentials jedoch auch durch den Membranwiderstand für passiv diffundierende Ionen beeinflusst wird. Werden beispielsweise in einer Froschringerlösung Chlorionen durch schlecht permeable Sulfationen in äquivalenter Weise ersetzt, so ergibt sich ein Anstieg des Membranpotentials als Ausdruck der erschwerten Diffusion für Sulfationen (zitiert nach USSING 1964).

Die Kraft, die aktiv Natriumionen durch die Haut befördert , wird als eine elektromotorische Kraft angesehen , deren Energie durch den Stoffwechsel der Zelle bereitgestellt wird. Als Bezeichnung für diese Kraft wird in der Literatur oft der Ausdruck " Natriumpumpe " gewählt. Ausführliche Erörterungen über deren Sitz in der Haut und deren Wirkungsmechanismus finden sich unter anderem in den folgenden Arbeiten : KOEFOED-JOHNSON (1958), USSING (1943), HUF (1953), SCHEER und MUMBACH (1960) LINDERHOLM (1953, 1954 und 1959). Übereinstimmend wird sie an die Innenseite in der Nähe der Basalmembran der Zelle lokalisiert. Man nimmt an , daß der Einstrom von Na von außen in die Zelle passiv und der Transport aus der Zelle in die Umgebung aktiv erfolgt.

Prinzipiell handelt es sich dabei um ein für alle Zellen tierischer Organismen gültiges Phänomen, das der lebensnotwendigen Erhaltung von intra- und extrazellulären Konzentrationsgradienten dient. Man

kann daher die Haut von Amphibien, ähnlich wie das Tubulusepithel der Niere und verschiedene andere epitheliale Strukturen, bei denen sich eine gerichtete transepitheliale Bewegung ausgebildet hat, als Sonderformen dieses allgemeinen Prinzips ansprechen.

Eine Änderung des Natriumnettotransportes erscheint grundsätzlich auf zweierlei Arten möglich, einmal durch Veränderung der Permeabilität auf der Außenseite der Zelle oder zum anderen durch einen Einfluß auf diejenigen Stoffwechselprozesse, die den aktiven Transport aus der Zelle bewirken.

Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom werden daher zu wichtigen Funktionsgrößen transportaktiver Strukturen, die auch durch chemische und physikalische Änderungen des Milieus (Badlösung) beeinflußt werden können. Beispielsweise verändern der p_H - Wert und die Temperatur beide Größen (SCHOFFENIELS 1955, KARGER und KRAUSE 1962). Auch das Sauerstoffangebot spielt eine Rolle (HUF et al. 1957, FUHRMANN 1952, LINDERHOLM 1952, FUHRMANN und USSING 1951). Einige Drogen wirken an der Haut von *Rana temporaria* und *esculenta* hemmend auf Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom, so z.B. Zyanide und Arsenide (HUF et al. 1957) oder Dinitrophenol und Sulfonamide (FUHRMANN 1952), ferner Strophanthin (KOEFOED-JOHNSON 1957) und CO_2 (USSING und ZERAHN 1951). Die oben erwähnten Substanzen wirken nur von der Innenseite

mit Ausnahme von Dinitrophenol und Atropin.

Für die Nettobewegung von Natrium und Wasser durch die Membran erwiesen sich die Hypophysenhinterlappenhormone (ADH) von eminenter Bedeutung: Sie stimulieren den aktiven Natriumtransport bei Zugabe von innen (FUHRMANN und USSING 1950, 1951, ANDERSEN und USSING 1952, LEAF et al. 1958), obwohl ihr Wirkungsort nach heute gültiger Auffassung in der äußeren Zellmembran gesehen wird. Dort ruft ADH eine Steigerung der Permeabilität hervor, so daß der Natriumpumpe an der Zellinnenseite mehr Ionen zum Transport angeboten werden, woraus eine Kurzschlußstromsteigerung resultiert. Auch Aldosteron bewirkt eine Steigerung des Natriumnettotransports an isolierten Membranen von Amphibien, wie u.a. CRABBE (1961) bewies.

Stoffe, die bei Menschen und Versuchstieren diuretisch wirken, sind auch auf ihren Einfluß auf die isolierte Amphibienhaut untersucht worden. So fanden HUF et al. (1957) beispielsweise, daß das Quecksilberdiuretikum Mersalyl und das Xanthin Theophyllin in kleinen Dosen den Natriumionen- und Wassertransport durch die Haut erhöhten, während sie in höheren Dosen beides erniedrigten. LINDERHOLM (1952 und 1959) beobachtete nach Gabe von Mersalyl zunächst ein geringes Ansteigen des Kurzschlußstroms sowie der Potentialdifferenz und nach ca 30 Minuten einen Abfall auf Null. Da er gleichzeitig ein

Absinken der Leitfähigkeit für Natriumionen fand , folgte er, daß der aktive Natriumionentransport völlig blockiert sei.

B Furosemid (Lasix^R)

Furosemid ist chemisch die 4-Chlor-N-(2-Furyl-methyl)-5-Sulfamoylanthranilsäure. Sie hat sich bei Menschen und Versuchstieren als gutes Diuretikum erwiesen. Nach i.v.-Injektion setzt die Wirkung schon innerhalb der ersten 3 - 5 Minuten ein und klingt innerhalb von 2 - 3 Stunden ab. Nach oraler Gabe beginnt die Wirkung nach 20 - 30 Minuten und hält 3 - 4 Stunden an (VORBURGER 1964 , TIMMERMAN et al. 1964). Schon eine orale Gabe von 40 - 50 mg bewirkt eine deutliche Diurese. Der Gipfelpunkt der Dosiswirkungskurve wird selbst bei 300 mg noch nicht erreicht (VORBURGER 1964, KLEINFELDER 1963 , LEDERBOGEN 1965).

Inzwischen ist der klinische Anwendungsbereich von Furosemid vielfach untersucht worden. Bei der Therapie von Oedemen jeder Genese hat es sich bewährt (STOKES und NUNN 1964, KLEINFELDER 1963, WALLNÖFER und HANUSCH 1965, KIESSLING 1965, LEDERBOGEN 1965), auch wird es unter Hinweis auf einen zusätzlichen membranabdichtenden Effekt bei Lungen- oder Hirnoedemen angewandt.

Im Vergleich mit anderen Diuretika erwies es sich sowohl bei gesunden Versuchspersonen als auch bei Patienten mit Oedemen überlegen (ROBSON et al.

1964, KLUTSCH et al. 1963).

Die Wirkung der Droge besteht in einer starken Ausscheidung von Natrium- und Chlorionen , die mit einer mäßigen Kaliurese verbunden ist. Der Anstieg der Natrium- und Chlorausscheidung geht der Erhöhung der Dosis weitgehend parallel,während die Sekretion von Kalium dabei nur ganz gering ansteigt (PUPITA et al. 1964, MOLL 1965, VORBURGER 1964,LEDERBOGEN 1965, MUSCHAWECK und HAJDU 1964, HEIDLAND 1964).

Die renalen Funktionsgrößen werden durch Furosemid folgendermaßen verändert:Es erhöht die glomeruläre Filtration (Inulinclearance) und den renalen Plasmafluß (PAH-Clearance); ein Befund, der von vielen Autoren erhoben wurde (SCHIRMEISTER und WILLMANN 1964 , KLÜTSCH et al. 1963 , HEIDLAND 1964 und JAHNECKE et al. 1964).Auch bei primär eingeschränkter Nierenfunktion führte Furosemid noch zu einer Filtrationserhöhung . So ließ sich bei Kranken mit chronischen Glomerulo- oder Pyelonephritiden, Nierenmißbildungen und vaskulären Nephropathien , die im Durchschnitt ein Glomerulumfiltrat von 69 ml / Min. hatten,die Inulinclearance erheblich steigern (JAHNECKE et al. 1964). Gleiche Ergebnisse erzielten KLÜTSCH (1963) sowie SCHIRMEISTER und WILLMANN (1964). Während Thiazide bei einer Einschränkung des Glomerulumfiltrates unter 20 ml/Min.nicht mehr wirksam sind, kann man mit Furosemid die Filtra-

tion bis zu einem Glomerulumfiltrat von 10 ml/Min. noch steigern (KLUTSCH et al. 1963, HEIDLAND et al. 1964, SCHELMER et al. 1965).

Da das Medikament bis zu 48 % der filtrierten Menge von Natrium und bis zu 60 % der filtrierten Menge an Wasser auszuschcheiden vermag, ergibt sich zwangsläufig, daß es auch auf die proximalen Tubulusabschnitte der Niere wirkt. DEFTJEN (1965) konnte mit Mikropunktionsuntersuchungen an der Ratteniere zeigen, daß am Ende des proximalen Konvolutes noch 60 % des Glomerulumfiltrates vorhanden waren; d.h., daß die Natriumrückresorption und damit die Rückresorption von Wasser im proximalen Tubulus gehemmt wird. Zahlreiche Autoren (SCHIRMEISTER und WILLMANN 1964, KLUTSCH et al. 1963, LARIZZA 1964, SUZUKI 1964) haben darauf hingewiesen, daß die auch beim Menschen beobachtete enorme diuretische Wirksamkeit (durchschnittlich bis zu 30 % des Glomerulumfiltrates) nur erklärbar ist, wenn man einen Angriffspunkt am proximalen Tubulus annimmt.

HOOK und WILLIAMSON konnten einen Einfluß auf die Harnkonzentrierung in der Niere feststellen, den sie mit einer Hemmung der Natriumrückresorption im aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife erklärten (auch SUZUKI 1964, VORBURGER 1964). Dafür sprechen ebenfalls die Befunde von BUCHBORN und ALKASTAKIS (1964), die unter osmotischer Diurese eine Negativierung von Tm^{CH_2O} bei Erhöhung der ef-

fektiven Nierengesamtdurchblutung und einer gesteigerten Kaliumsekretion zeigen konnten. Außerdem beobachtete die Arbeitsgruppe einen hypotonen Diuresezuwachs und die Ausscheidung eines hypotonen Urins, was darauf hinweist, daß Furosemid die Permeabilität für Wasser am distalen Nephron herabsetzt. Formal werden damit die Bedingungen eines ADH-Antagonismus erfüllt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen: Furosemid erhöht die glomeruläre Filtration und besitzt eine außerordentlich starke Hemmwirkung auf die tubuläre Natriumrückresorption. Darüber hinaus muß eine Verminderung der Wasserpermeabilität in den distalen Nephronabschnitten angenommen werden.

Neben den vielseitigen klinischen Untersuchungen ist auch sein Einfluß auf die isolierte Amphibienhaut geprüft worden: NAGEL und KARGER (1964) fanden an der isolierten Froschmembran einen Anstieg des Potentials neben unverändertem Kurzschlußstrom bei Außenzugabe; HERMS und HOFFMANN (1965) dagegen einen Kurzschlußstromanstieg neben unverändertem Potential ohne Spezifizierung des Ortes der Zugabe. Diese für unser Thema wesentlichen Befunde werden ausführlich in der Diskussion besprochen.

C Äthacrynsäure (Hydromedin^R)

Es handelt sich bei der Substanz chemisch um die 2-3-Dichlor-4-(2-Methylenbutyryl)-Phenoxyessigsäure. Ähnlich wie Furosemid besitzt Äthacrynsäure

einen ausgeprägten diuretischen Effekt (CAFRUNY 1964, HILTON und KESSLER 1964, MAHER et al., MÜLLER und SCHAUB 1964). Die Wirkung tritt oral appliziert bereits innerhalb von 30 Minuten ein und erreicht nach etwa 2 Stunden ihren Höhepunkt (CAFRUNY 1964, CANNON et al. 1965, LEDINGHAM 1964, MAC GAFFELY et al. 1964, MAHER et al. 1964). Die Wirkungsdauer beträgt etwa 6 - 8 Stunden.

Äthacrynsäure ist bei Oedemen aller Schweregrade und verschiedenster Genese indiziert. Das Präparat wirkt durch eine Natrium- und Wasserausscheidung, die wesentlich höher liegt als nach Verabreichung von Quecksilberpräparaten , Carboanhydrasehemmern, Thiaziden und Aldosteronantagonisten (BAER et al. 1962 , CAFRUNY 1964 , CANNON et al. 1963 , DOLLERY 1965, GOLDBERG et al. 1964, HILTON und KESSLER 1964, LEDINGHAM 1964).

Bei Oedemen, die auf diese Diuretika nicht oder nur ungenügend ansprachen, hat Äthacrynsäure in den Versuchen vieler Autoren noch zum Erfolg geführt . So nimmt z.B. die Ausscheidung von Natrium und Chlor in Versuchen an Hunden erheblich zu, wenn man einer maximal wirksamen Hydrochlorothiaziddosis Äthacrynsäure zusetzt. Die kombinierte Wirkung beider Substanzen, insbesondere auf die Natriumausscheidung, ist dabei stärker als aus der Summe der Einzelwirkungen zu erwarten wäre. Dieser synergistische Effekt läßt vermuten, daß Äthacrynsäure den Mechanis-

mus der Natriumrückresorption blockiert , der von Thiaziden nicht erfaßt wird (CAFRUNY 1964). Die Annahme wurde durch mehrere Untersuchungen bestätigt. GOLDBERG et al. (1965) stellten bei Versuchen über den Verdünnungs- und Konzentrierungsmechanismus an der Hundeniere fest, daß es unter Äthacrynsäure bei maximaler Wasserdurese zu einem stärkeren Anstieg der osmolaren Clearance als dem des Urinvolumens kam. Gleichzeitig wurde die "Freie Wasserclearance" erheblich reduziert. Eine Erklärung dieser Befunde sahen sie in einer Hemmung der Natriumrückresorption im aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife. Ähnliche Ergebnisse bei anderen Versuchstieren und bei Menschen wurden auf gleiche Weise interpretiert (FOLTZ 1963 , BEYER et al. 1965, HERRMANN 1960).

Neben diesem Mechanismus , der die Erklärung für eine Ausschaltung von $Tm^{C}H_2O$ während massiver Natriurese bei dehydratisierten Untersuchungstieren und Menschen bot, forderten MAC GAFFEY et al. (1964) einen zusätzlichen blockierenden Effekt auf die Natriumrückresorption im proximalen Tubulus, um das Ausmaß der Natriurese zu erklären.

Außerdem scheint Äthacrynsäure wie Furosemid auch einen Einfluß auf die Wasserrückresorption im distalen Nephron zu haben: Unveröffentlichte Befunde von EDEL et al. zeigten nämlich unter Anwendung des Präparates einen hypotonen Diuresezuwachs mit Nega-

tivierung von $Tm^{C}H_2O$ bei osmotischer Diurese. Dieser Befund weist darauf hin, daß Äthacrynsäure neben den bekannten Eigenschaften einen zusätzlichen Angriffspunkt am distalen Nephron besitzt, indem es dort die Wasserpermeabilität der Tubuluswand herabsetzt. Folglich werden genauso wie unter Furosemid wenigstens formal die Bedingungen eines ADH-Antagonismus erfüllt.

Eine Erhöhung des Glomerulumfiltrates wird unter Äthacrynsäure nicht beobachtet, von GOLDBERG et al. (1965) wird sogar eine geringe Verminderung mitgeteilt. Selbst beim erheblich eingeschränkten Filtrat ist jedoch auf Grund seines Angriffspunktes an den verschiedenen Nephronabschnitten noch ein deutlicher diuretischer Effekt zu erzielen (CANNON et al. 1964, HILTON und KESSLER 1964, KAYSER 1964).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß Äthacrynsäure wegen der starken Ausscheidung von Natrium, Chlor und Wasser bei Oedemen verschiedenster Genese indiziert ist. Der diuretische Effekt von Äthacrynsäure ist besser als der von Quecksilberdiuretika, Aldosteronantagonisten und Thiaziden. Die Wirkung besteht darin, daß die Natriumrückresorption in allen Tubulusabschnitten gehemmt und überdies im distalen Tubulus sowie in den Sammelrohren die Wasserpermeabilität herabgesetzt wird.

An der isolierten Amphibienhaut beobachteten HERKES und HOFFMANN (1965) unter Äthacrynsäure einen Ein-

fluß auf Kurzschlußstrom und Widerstand ; Befunde, die in der Diskussion ausführlich erörtert werden.

Zusammenfassung und Problemstellung

Furosemid und Äthacrynsäure haben sich im Tierexperiment und in der klinischen Medizin vor allem als Hemmstoffe der aktiven Natriumrückresorption in der Niere erwiesen. Außerdem deuten gewisse Befunde darauf hin , daß beide Substanzen zusätzlich einen Einfluß auf die Permeabilitätsverhältnisse bestimmter Nephronabschnitte haben.

Es erschien deshalb sinnvoll, unter Verwendung der sogenannten USSING'schen Kurzschlußstrommethode die Wirkung dieser Substanzen an der isolierten Haut von Amphibien zu überprüfen, um damit nach Möglichkeit weitere Aufschlüsse über ihre Wirkungsweise zu erhalten.

M e t h o d i k

Als Versuchstiere wurden männliche Tiere der europäischen Krötenart Bufo bufo verwandt. Sie wurden im Winter in einem geheizten Kellerraum und im Sommer in einem schattigen Käfig im Freien untergebracht. Stets hatten sie Zugang zu Wasser. Als Nahrung erhielten sie Mehlwürmer.

Vor jedem Versuch wurden die Kröten zunächst einige Minuten in Froschringerlösung gesetzt, dann dekapiert und ihr Rückenmark mittels einer Sonde zer-

stört. Anschließend wurde die Bauchhaut mit einer Schere stumpf abpräpariert und sofort in Ringerlösung gelegt.

Die gesamte Meßanordnung entsprach der von USSING und ZERAHN (1951) angegebenen Methode. Die Einzelheiten sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Die Haut trennte als Membran zwei Plexiglaskammern voneinander, die an Ständern drehbar befestigt waren. Beide Kammern hatten die Form eines Kegels mit einer offenen Grundfläche von $3,14 \text{ cm}^2$. In den Wandungen befanden sich je 4 Bohrungen, in die Ringeragarbrücken eingeführt wurden, und zwar in Membrannähe zwei Brücken von 2 mm Durchmesser und an der Kegelspitze zwei andere von 4 mm Durchmesser. Diese Brücken, bestehend aus Kunststoffschläuchen, wurden mit einem heißen Gel gefüllt, das sich aus einer Mischung von 30 ml Froschringerlösung und 1 g Agarpulver zusammensetzte. Die äußeren Enden der membran nahen Brücken waren mit Kalomel-Kaliumchlorid-Elektroden in Kontakt. Die Potentialdifferenz zwischen diesen beiden Elektroden konnte an einem Knick-Potentiometer auf 1 mV genau abgelesen werden. Die äußeren Enden der membranfernen Brücken tauchten in 3 - molare Kaliumchloridlösung ein, ebenso wie zwei Drähte, die mit gesättigtem Silberchlorid überzogen waren. Diese wurden als Elektroden benutzt, um Strom von außen zuzuführen, der einer 24-Volt-Batterie entnommen wurde und mit Hilfe eines Widerstandes geregelt werden konnte. Die

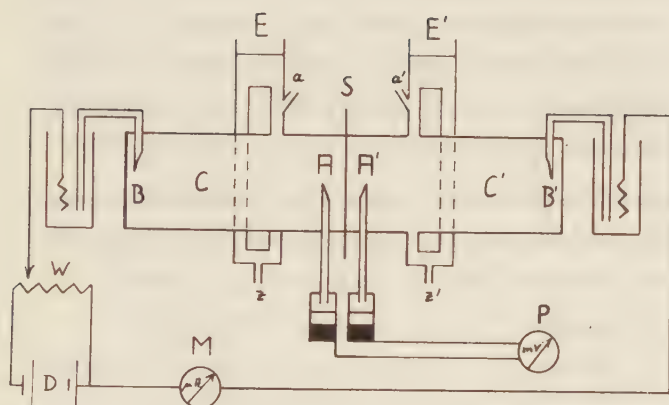


Abb. 1

Schema der Versuchsanordnung:

C und C'	Plexiglaskammern
S	Krötenhaut
A und A'	Membrannahe Elektroden
B und B'	Membranferne Elektroden
E und E'	Einfüllöffnungen
a und a'	Sauerstoff-Einlaßrohre
z und z'	Entleerungsrohre
P	Potentiometer
M	Mikroampèremeter
W	Regelwiderstand
D	Batterie

Stromstärke ließ sich an einem Mikroamperemeter auf 1 Mikroampère genau ablesen.

Jede der Plexiglaskammern faßte 10 ml Ringerlösung. Um die Flüssigkeit in Bewegung zu halten und gleichzeitig den oxydativen Stoffwechsel der Membran aufrechtzuerhalten, wurde jede Kammer mit Sauerstoff durchperlt. Durch Öffnungen an den Ober- und Unterseiten der Kammern konnte die Ringerlösung abfließen bzw. durch neue ersetzt werden.

Alle Untersuchungen wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die verwendete Froschringerlösung besaß folgende Zusammensetzung:

Natrium	114,0 mval/l,
Kalium	1,9 mval/l,
Calcium	0,9 mval/l,
Bicarbonat	2,38 mval/l.

Vor und nach einem Versuch wurde der p_H -Wert der Lösung bestimmt. Er lag bei allen Messungen in einem Bereich von 7,8 - 8,5 .

Von jedem Tier ließen sich aus der isolierten Bauchhaut zwei Membranen von mindestens 3,14 cm² Oberfläche (Innendurchmesser der Kammern 2 cm) gewinnen, wobei eine Hälfte als Kontrolle der anderen verwandt wurde.

Nach dem Einspannen der Haut zwischen beide Kammerhälften wurde die Ringerlösung eingefüllt und das Membranpotential gemessen. Danach wurde durch Stromzufuhr über die äußeren Elektroden dieses Potential

auf Null kompensiert und der dabei fließende Strom, der sogenannte Kurzschlußstrom, abgelesen. Eine Zugabe von Medikamenten erfolgte erst dann, wenn sich alle Meßgrößen 20 Min. als konstant erwiesen hatten.

Die zu untersuchenden Pharmaka wurden jeweils entweder nur innen oder nur außen zugegeben. Folgende Konzentrationen kamen zur Anwendung:

2 mg Furosemid ¹⁾	/	10 ml Lösung,
0,4 mg Äthacrynsäure ²⁾	/	10 ml Lösung,
vergleichshalber auch:		
4 Mikroliter Salyrgan ^R ³⁾	/	10 ml Lösung.

Diese Dosen hatten sich in Vorversuchen als noch mit Sicherheit wirksame Mengen erwiesen. Eine genaue Dosiswirkungsanalyse wurde nicht durchgeführt.

Unmittelbar nach Zugabe des jeweiligen Medikamentes wurden Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom fortlaufend registriert, um auch plötzliche Änderungen erfassen zu können. Anschließend wurden die Meßwerte alle 5 - 10 Minuten registriert.

Nach einer Stunde Wirkungsdauer wurde die Substanz ausgewaschen, indem die medikamentenhaltige Ringerlösung mehrfach durch frische ersetzt wurde. Nach dem Badlösungswechsel wurden Potentialdifferenz

1) Lasix^R, Fa Hoechst, Frf.

2) Hydromedin^R, Fa Sharp & Dohme, München

3) Salyrgan^R, Fa Hoechst, Frf.

und Kurzschlußstrom weiterhin über einen Zeitraum von 60 Minuten beobachtet. Der elektrische Widerstand wurde nach dem OHM'schen Gesetz ($R = \frac{U}{I}$) für alle Meßpunkte errechnet.

Die spontane Aktivität der Membranen wies eine erhebliche biologische Streuung auf. Um die verschiedenen Meßreihen besser vergleichen zu können, wurden daher für alle Versuche die unmittelbar vor Zugabe des Medikamentes registrierten Werte gleich 100 gesetzt und alle übrigen Meßwerte als prozentuale Änderungen dieses Ausgangswertes aufgetragen. Der Zeitpunkt der Medikamentenzugabe wurde als Zeitpunkt Null bezeichnet.

E r g e b n i s s e

1. Kontrollversuche

Eine repräsentative Gruppe von Meßergebnissen ist in Abbildung 2 wiedergegeben. Es zeigte sich, daß unter den beschriebenen Bedingungen Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom über mehrere Stunden von der Membran aufrechterhalten wurden, wobei allerdings eine nicht unerhebliche biologische Streuung bestand. Definitionsgemäß kam es bei leichtem Abfall des Kurzschlußstromes und bei in etwa gleichbleibender Potentialdifferenz zu einer geringen Widerstandserhöhung.

Um die Brauchbarkeit der isolierten Bauchhaut von

Kontrolle.

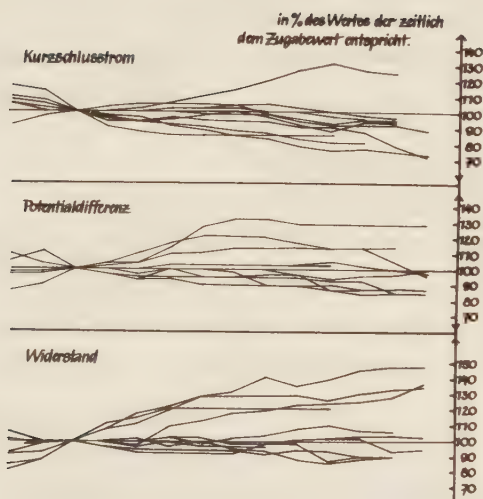


Abb. 2

Das Verhalten von Kurzschlußstrom (Mikro-ampère), Potentialdifferenz (mV) und errechnetem Widerstand an der isolierten Haut von Bufo bufo ohne Zusatz eines Medikamentes . Alle Werte sind als prozentuale Änderungen des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 0 aufgetragen (n=10) . Beobachtungszeit insgesamt 180 Minuten.

Bufo bufo für die Untersuchung von Diuretika im Vergleich zu derartigen Untersuchungen an Membranen anderer Amphibien sicherzustellen, wurden zunächst orientierende Versuche mit dem Quecksilberdiuretikum Salyrgan durchgeführt, da aus den Versuchen von LINDERHOLM (1952, 1959) an der Froschhaut mit Mersalyl (aus der gleichen Stoffgruppe) der Einfluß auf Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom bekannt ist. Aus diesen Gründen wurde Salyrgan auch in verschiedenen Dosierungen gegeben (s. Seite 7).

2. Die Wirkung von Salyrgan^R

a) bei Zusatz auf der Innenseite (s. Abb. 3)

Bei einer Dosierung von 4 Mikrolitern/10 ml Lösung ist ein gleichsinniges Verhalten von Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom festzustellen. Im Mittel stieg der Kurzschlußstrom innerhalb von 25 Minuten um 20 % an und fiel dann etwa im gleichen Zeitraum wieder zum Ausgangswert ab. Danach erfolgte etwa eine Stunde lang ein steiler Abfall, wobei letztlich asymptotisch Null erreicht wurde. Die Potentialdifferenz verhielt sich unterschiedlich: Bei einigen Meßreihen wurde bei langsamem Anstieg durchschnittlich nach 40 Minuten 20 % des Ausgangswertes erreicht; der Abfall zum Ausgangswert ging dann schneller und steiler vonstatten. Innerhalb von 60 Minuten erfolgte dann auch hier ein Abfall auf niedrige Werte. Einige Kurven zeigten in etwa eine kontinuierliche Verminderung der Potential-

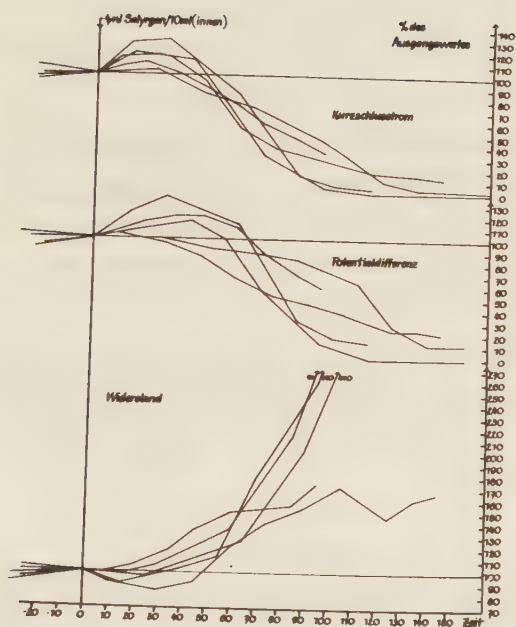


Abb. 3

Das Verhalten von Kurzschlußstrom (Mikroampere), Potentialdifferenz (mV) und errechnetem Widerstand bei Zusatz von Saltyrgan auf der Innenseite. Alle Werte sind als prozentuale Änderungen des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 0 aufgetragen (n=5).

differenz auf 10 - 20 % des Ausgangswertes über einen Zeitraum von 150 Minuten.

Der Widerstand zeigte in dieser Versuchsreihe in den ersten 30 Minuten keine wesentliche Änderung, stieg dann aber allmählich an und erreichte in einigen Fällen Werte, die das $4\frac{1}{2}$ -fache des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 0 überschritten.

Bei Dosen über 6 Mikroliter / 10 ml Badlösung fielen Kurzschlußstrom und Potentialdifferenz sofort ab und erreichten innerhalb von 30 Minuten den Wert Null oder sogar negative Werte. Dieser Vorgang war nicht mehr reversibel.

Bei einer Dosierung von 2 Mikrolitern / 10 ml stiegen die Meßgrößen eine Stunde lang an und blieben dann konstant, Erst nach dem Auswaschen war ein Abfall erkennbar.

b) bei Zusatz auf der Außenseite (s. Abb. 4)

Im Gegensatz zu den Meßreihen bei Innenzugabe war bei einer Dosis von 6 Mikrolitern / 10 ml Badlösung keine eindeutige Veränderung von Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom im Verhältnis zu den Kontrollversuchen zu beobachten: Der Kurzschlußstrom streute um den Ausgangswert, während Potentialdifferenz und Widerstand teilweise eine ansteigende Tendenz aufwiesen.

Zusammenfassend gestatten diese orientierenden Untersuchungen von Salyrgan folgende Feststellungen:

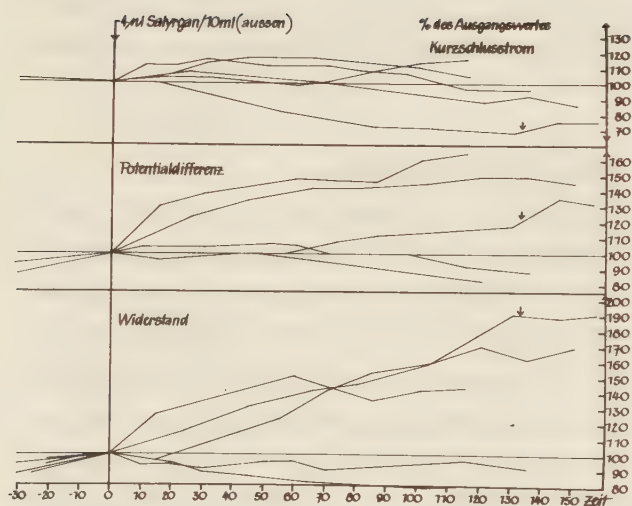


Abb. 4

Das Verhalten von Kurzschlußstrom (Mikroampère), Potentialdifferenz (mV) und errechnetem Widerstand bei Zusatz von Salyrgan auf der Außenseite . Die Werte sind als prozentuale Änderungen des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 0 aufgetragen. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt , an dem die medikamentenhaltige Lösung durch reine Ringerlösung ersetzt wurde. (n=5, Zeit in Minuten)

Das Präparat ist nur auf der Innenseite der Membran wirksam . Je nach Höhe der verwendeten Dosis kommt es entweder zunächst zu einem Anstieg oder sofortigen Abfall von Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom. Letztlich erfolgt aber immer eine nachhaltige Verminderung beider Größen. Prinzipiell gleiche Ergebnisse wurden von LINDERHOLM (1952 und 1959) an der isolierten Bauchhaut von Fröschen erzielt, ein Befund , der in der Diskussion noch erörtert werden soll.

3. Die Wirkung von Furosemid

a) bei Zusatz auf der Innenseite (s. Abb. 5)

Bei Zugabe von 2 mg/10 ml Badlösung kam es im Verlauf der nachfolgenden 30 Minuten zu einem allmählichen Absinken des Kurzschlußstromes auf gut ein Drittel des Ausgangswertes. Die Streuung der Einzelwerte war zwar groß, in allen Fällen wurde aber ein prinzipiell gleichartiges Verhalten des Kurzschlußstromes beobachtet . Nach zweimaligem Wechsel der Badlösung kam es in einigen Fällen zu einem geringen Wiederanstieg des Kurzschlußstromes , jedoch wurde in einem Zeitraum von einer Stunde der Ausgangswert in keinem Falle erreicht.

Das Verhalten der Potentialdifferenz erwies sich in dieser Versuchsreihe als sehr viel uneinheitlicher. Eine Tendenz zu geringer und langsam einsetzender Abnahme ist allerdings bei den meisten Versuchen zu erkennen . Ähnlich wie der Kurzschlußstrom zeigte

auch die Potentialdifferenz nach Badl~~ösungs~~wechsel in einigen Fällen einen geringen und langsamen Wiederanstieg.

Die relativ große Streubreite der Einzelversuche macht eine entsprechende Streubreite des Widerstandes verständlich . Trotzdem zeigt die Abbildung 5 deutlich den im Einzelfall unterschiedlich starken aber stets nachweisbaren Anstieg. In einigen Fällen wurde das mehr als Zweifache des Ausgangswertes erreicht.

b) bei Zusatz auf der Außenseite (s. Abb. 6)

Verglichen mit den Kontrollversuchen wies der Kurzschlußstrom unter Furosemid in der gleichen Dosierung (0,2 mg/ml) keine signifikante Änderung auf: In beiden Fällen war ein leichter kontinuierlicher Abfall der Meßwerte während der ganzen Versuchsdauer erkennbar. Dagegen stieg die Potentialdifferenz bei den meisten Versuchen sofort steil an und erreichte innerhalb von 20 - 30 Minuten den Höchstwert (bis zu 160 %). Dieser Anstieg erwies sich bei Badl~~ösungs~~wechsel als reversibel.

Erwartungsgemäß zeigte der Widerstand in allen Versuchen eine steigende Tendenz , die etwa 30 Minuten nach Zugabe des Medikamentes ihr Maximum erreichte und dann während der Dauer der ganzen Versuche weitgehend konstant blieb . Die absolute Erhöhung des Widerstandes schwankte jedoch auch in diesen Versuchen beträchtlich.

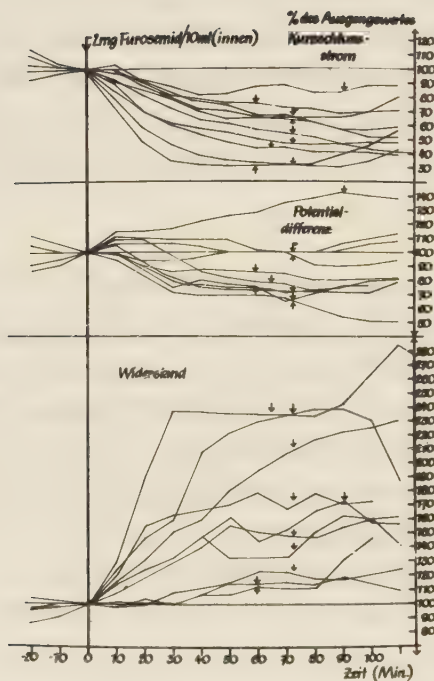


Abb. 5

Das Verhalten von Kurzschlußstrom (Mikroampère), Potentialdifferenz (mV) und errechnetem Widerstand bei Zusatz von Furosemid auf der Innenseite. Die Werte sind als prozentuale Änderungen des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 0 aufgetragen. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt, an dem die medikamentenhaltige Lösung durch reine Ringerlösung ersetzt wurde. (n=10)

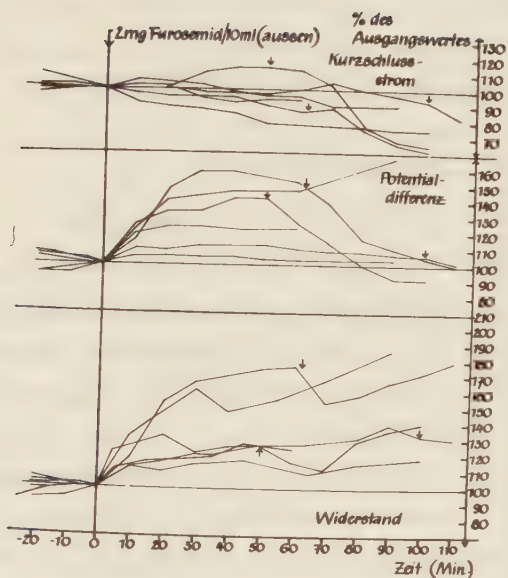


Abb. 6

Das Verhalten von Kurzschlußstrom (Mikroampère), Potentialdifferenz (mV) und errechnetem Widerstand bei Zusatz von Furosemid auf der Außenseite. Die Werte sind als prozentuale Änderungen des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 0 aufgetragen. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt, an dem die medikamentenhaltige Lösung durch reine Ringerlösung ersetzt wurde. (n=6)

Zusammenfassend läßt sich feststellen: Furosemid bewirkte in einer Dosis von 2 mg/10 ml Badlösung bei Innenzugabe eine deutliche Verminderung des Kurzschlußstromes bei nur geringgradigem Abfall der Potentialdifferenz, während es bei Zugabe der gleichen Dosis auf der Außenseite nur zu einer deutlichen Erhöhung der Potentialdifferenz kam.

4. Die Wirkung von Äthacrynsäure

a) bei Zusatz auf der Innenseite (s. Abb. 7)

Nach Zugabe von 0,4 mg / 10 ml Badlösung zeigte der registrierte Kurzschlußstrom ein sehr unterschiedliches Verhalten ; sowohl ein allmählicher Anstieg während der ersten 60 Minuten als auch ein langsamer Abfall wurden beobachtet . Der Anstieg konnte durch Badlösungswechsel rückgängig gemacht werden, während der bereits erniedrigte Kurzschlußstrom nach Badlösungswechsel seine Richtung nicht änderte.

Die Potentialdifferenz dagegen verhielt sich eindeutiger: Nach Zugabe erfolgte 60 Minuten lang ein mäßiger Anstieg auf 120 - 150 %, der in den meisten Versuchen nach dem Auswaschen weitgehend reversibel war.

Entsprechend den unterschiedlichen Kurzschlußstromkurven zeigte der Widerstand entweder einen kontinuierlichen Anstieg oder einen vorübergehenden Abfall.

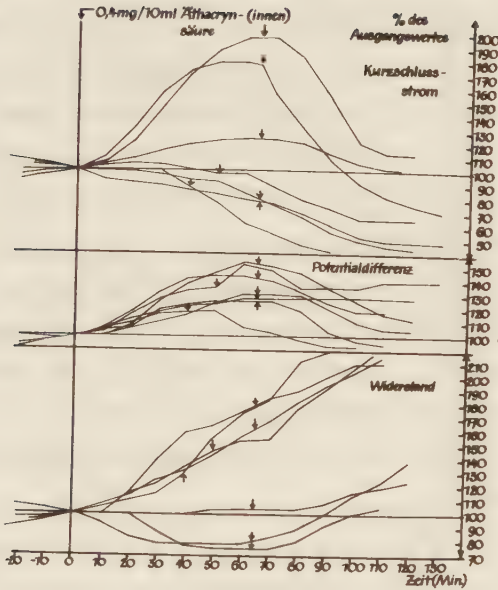


Abb. 7

Das Verhalten von Kurzschlußstrom (Mikroampère), Potentialdifferenz (mV) und errechnetem Widerstand bei Zusatz von Æthacrynsäure auf der Innenseite. Die Werte sind als prozentuale Änderungen des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 0 aufgetragen. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt, an dem die medikamentenhaltige Lösung durch reine Ringerlösung ersetzt wurde. (n=7)

b) bei Zusatz auf der Außenseite (s. Abb. 8)

Unter der gleichen Menge Äthacrynsäure (0,4 mg / 10 ml) kam es sofort nach der Zugabe zu einem steilen Anstieg des Kurzschlußstromes . Der Höchstwert war bereits nach 10 Minuten erreicht (im Mittel 150 % des Ausgangswertes). Anschließend sanken die Kurven eine Stunde lang leicht ab, jedoch nicht unter den Wert bei Zugabe des Medikamentes. Nach dem Auswaschen erfolgte dann ein wesentlich steilerer Abfall , so daß letztlich unter dem Ausgangswert (zwischen 60 und 90 %) Konstanz erzielt wurde.

Die Potentialdifferenz verhielt sich ähnlich. Zu nächst erfolgte ebenso ein steiler Anstieg auf 110-150 % des Ausgangswertes. Dann blieb die Potentialdifferenz in den meisten Versuchen etwa 60 Minuten konstant , um nach dem Auswaschen - mit einer Ausnahme - in die Nähe des Ausgangswertes zurückzu-kehren.

Der Widerstand wies zunächst infolge des stärkeren Anstiegs des Kurzschlußstromes einen leichten Abfall auf, um dann langsam wieder den ursprünglichen Wert zu erreichen . Erst nach dem Auswaschen stieg er stärker an und blieb etwa nach 80 Minuten Versuchsdauer konstant.

Als Ergebnis dieser Untersuchung darf festgestellt werden: Äthacrynsäure bewirkte bei Außenzugabe einen sofortigen und nachhaltigen Anstieg von Kurzschlußstrom und Potentialdifferenz. Bei Zugabe auf der In-

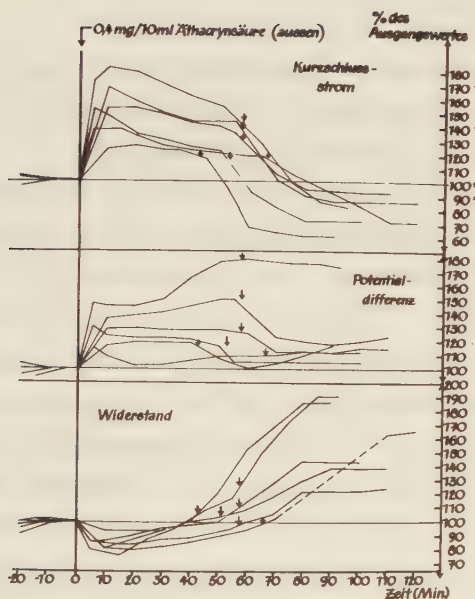


Abb. 8

Das Verhalten von Kurzschlußstrom (Mikroampère), Potentialdifferenz (mV) und errechnetem Widerstand bei Zusatz von Äthacrynsäure auf der Außenseite. Die Werte sind als prozentuale Änderungen des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 0 aufgetragen. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt, an dem die medikamentenhaltige Lösung durch reine Ringerlösung ersetzt wurde. (n=6)

nenseite kam es zu einem ganz allmählichen Anstieg der Potentialdifferenz, während der Kurzschlußstrom ein sehr unterschiedliches Verhalten aufwies.

D i s k u s s i o n

Der Besprechung der Ergebnisse sollen zwei grundsätzliche Bemerkungen vorausgeschickt werden:

1. Wie in der einleitenden Literaturübersicht ausgeführt wurde, gilt die Größe des Kurzschlußstromes an einer isolierten Amphibienhaut als direktes Maß für den Natriumnettotransport durch diese Membran. Die Höhe der hierbei auf Null zu kompensierenden Potentialdifferenz wird jedoch nicht nur von der elektromotorischen Kraft für die Natriumbewegung, sondern auch von den Permeabilitätsverhältnissen für passiv diffundierende Ionen (insbesondere Chlor) bestimmt.

Die hier mitgeteilten experimentellen Befunde wurden unter der Voraussetzung durchgeführt, daß dieses allgemeingültige Prinzip: Kurzschlußstrom = aktiver Natriumnettotransport auch unter Einwirkung der hier geprüften Pharmaka Gültigkeit besitzt. Dies ist mit größter Wahrscheinlichkeit der Fall. Solange jedoch die in Betracht kommenden Fluxraten der verschiedenen Ionenarten mit Hilfe von radioaktiven Isotopen nicht direkt gemessen werden, muß man berücksichtigen, daß aus der Registrierung von Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom sowie dem daraus

errechneten elektrischen Widerstand nur summarische Aufschlüsse über transepitheliale Ionenbewegungen erhalten werden können.

2. Es ist naheliegend, das Modell der transportaktiven Membran mit dem Tubulusepithel der Niere zu vergleichen. Dabei entspräche die Außenseite der Membran dem Tubuluslumen und die Innenseite dem der Basalmembran angrenzenden gefäßführenden Bindegewebe (Blutseite). Man muß sich jedoch dabei darüber im klaren sein, daß derartige Analogieschlüsse bei unseren Modellversuchen nur mit großem Vorbehalt möglich sind.

Betrachtet man nun die durch Zugabe der verschiedenen Diuretika bewirkte Änderung von Kurzschlußstrom und Potentialdifferenz, so taucht zunächst die Frage auf, ob es sich dabei nicht um eine indirekte Einwirkung durch p_H -Verschiebungen handelt. Aus diesem Grunde wurde in allen Versuchen der p_H -Wert der Badlösung vor und nach Zugabe der entsprechenden Medikamente geprüft, damit sichergestellt war, daß diese Möglichkeit der Erklärung nicht zutraf.

Besonders auffällig erscheint uns, daß die Diuretika Furosemid und Äthacrynsäure Wirkungsunterschiede je nach Zugabe auf der Innen- oder Außenseite aufweisen. Zunächst ist man geneigt anzunehmen, daß derartige Substanzen den Ort ihrer Wirkung auf dem Blutwege erreichen und deshalb auf der Membranin-

nenseite eher und ausgeprägter als auf der Außenseite wirken, obwohl seit längerer Zeit bekannt ist, daß einige andere Stoffe wie z.B. Pilocarpin und Atropin den aktiven Natriumtransport (Kurzschlußstrom) nur bei Zugabe auf der Außenseite zu steigern vermögen (KIRCHNER 1955).

Mit S a l y r g a n wurden von uns prinzipiell die gleichen Ergebnisse erzielt wie von LINDERHOLM (1959) mit Mersalyl, einem anderen Quecksilberdiuretikum. Die Wirkung von Salyrgan hinsichtlich Kurzschlußstrom und Potentialdifferenz ist eindeutig: Es ist nur auf der Innenseite wirksam . Der Effekt besteht in einer gleichsinnigen Änderung des Kurzschlußstromes sowie der Potentialdifferenz . Dabei ist eine Abhängigkeit von der Dosis feststellbar: Bei 2 Mikrolitern / 10 ml Ringerlösung erfolgte zunächst ein Anstieg , bei 4 Mikrolitern / 10 ml ein sofortiger Abfall. In beiden Fällen aber sanken die Meßgrößen letztlich ab, so daß man eine Hemmung des aktiven Natriumtransportes folgern muß.

Prinzipiell läßt sich auf Grund derartiger Versuche nicht entscheiden, ob es sich dabei um eine direkte Einwirkung auf den aktiven Transportprozeß oder um eine Verminderung der Permeabilität für Natriumionen handelt.

Bei F u r o s e m i d ist die Deutung der Wirkungsweise schwieriger: In unseren Versuchen zeigte sich bei Außenzugabe eine Potentialerhöhung neben un-

verändertem Kurzschlußstrom. NAGIL und KARGER (1964) erzielten in Versuchen an der Haut von *Rana temporaria* das gleiche Ergebnis. Auf Grund dessen könnte die Wirkungsweise von Furosemid in einer Widerstandserhöhung für passive Anionen gesehen werden.

Bei Innenzugabe wurde dagegen von uns eine Erniedrigung des Kurzschlußstromes beobachtet, d.h. es kam zu einer Abnahme des Natriumtransportes. So erscheinen je nach dem Ort der Zugabe von Furosemid zwei Wirkungsweisen besonders ausgeprägt:

Bei Zugabe auf der Außenseite kommt es als Ausdruck einer verminderten Permeabilität für passiv bewegte Anionen zu einer Erhöhung der Potentialdifferenz. Für Veränderungen der Permeabilitätsverhältnisse fanden auch BUCHBORN und ANASTASAKIS (1964) Anhaltspunkte: Der beobachtete hypotone Diuresezuwachs setzt zumindest für Wasser eine Permeabilitätsverminderung im distalen Nephron voraus.

Wie schon erwähnt, läßt sich aus der Verminderung des Kurzschlußstromes nur ersehen, daß der Natriumtransport eingeschränkt ist. Selbstverständlich kann man auch hier nicht entscheiden, ob die Ursache in einer Permeabilitätsveränderung oder in einer Blockierung der "Natriumpumpe" liegt. Es erscheint der Hinweis wichtig, daß dieser Effekt (Verminderung des Kurzschlußstromes) nur bei Zugabe auf der Innenseite der Membran beobachtet wird.

Bei gleichzeitiger Zugabe auf beiden Seiten müßte es zu einer Überlagerung beider Effekte kommen, so daß eine Potentialerhöhung und eine Kurzschlußstromerniedrigung resultieren würden. Die fehlende Kurzschlußstromerniedrigung in den Versuchen von NAGEL und KARGER ist möglicherweise dadurch zu erklären, daß die beiden Wirkungen bei gleichzeitiger Innen- und Außenzugabe verschieden stark ausgeprägt sind.

Nach Fertigstellung des experimentellen Teils der Arbeit berichteten HERMS und HOFFMANN (1965) über prinzipiell gleichartige Untersuchungen, ohne allerdings den Ort der Zugabe eindeutig anzugeben. Die Autoren fanden an der Haut von *Rana esculenta* unter Furosemid eine Kurzschlußstromerhöhung; ein Ergebnis, das zu unseren und anderen Befunden im Widerspruch steht. Eine eindeutige Erklärung für diese Differenzen können wir nicht geben. Möglicherweise sind sie in Tiergattungsunterschieden begründet. (NAGEL und KARGER verwandten *Rana temporaria*). Von Atropin, Tubocurarin und Pilocarpin ist z.B. bekannt, daß sie an der Haut von *Rana esculenta* und *Bufo bufo* den Natriumionentransport stimulieren, nicht aber an der Haut von *Rana temporaria* (KIRCHNER 1955).

Eine Erklärung der Wirkungscharakteristika von Äthacrynsäure bereitet noch größere Schwierigkeiten: Prinzipiell beobachteten wir bei Innen- und Außenzugabe gleiche Effekte, nämlich ei-

ne Erhöhung von Kurzschlußstrom und Potentialdifferenz . Da der Anstieg bei Außenzugabe schneller und steiler erfolgte, liegt es nahe, den Angriffspunkt der Droge zunächst an der Außenschicht der Haut zu suchen . Nach dieser Vorstellung wäre es möglich, daß der passive Eintritt von Natriumionen erleichtert wird , was zur Folge hätte , daß der "Natriumpumpe" mehr Natriumionen zugeführt werden. Der resultierende Anstieg des Natriumfluxes fände seinen Ausdruck in der Erhöhung des Kurzschlußstromes. Die gleichzeitige Steigerung der Potentialdifferenz könnte auf eine im Verhältnis zu Natriumionen geringere Permeabilitätserhöhung für Chlorionen hinweisen.

Nach HERMS und HOFFMANN (1965) liegt der Effekt von Äthacrynsäure an isolierten Membranen bei kleinen Dosen (10^{-5} Mol/l) in einer Steigerung des aktiven Natriumionentransportes. Mit steigender Dosis überwiegt immer mehr der "Membraneffekt" im Sinne einer Permeabilitätszunahme für Wasser und Natrium . Bei Dosen von 10^{-3} Mol/l wurde sogar eine extreme Kurzschlußstromerhöhung mit absinkender Potentialdifferenz beobachtet.

Ob die Hypothese der unterschiedlichen Permeabilitätsveränderungen für Natrium- und Chlorionen als Erklärung für unsere Befunde allein ausreicht, erscheint zweifelhaft. Jedoch ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß Permeabilitätsveränderungen bei der

Wirkungsweise von Äthacrynsäure sowie von Furosemid eine Rolle spielen . Der hypotone Diuresezuwachs , der in unveröffentlichten Versuchen von EDEL et al. bei intravenös applizierter Äthacrynsäure beim Menschen beobachtet wurde , könnte ebenfalls Anhaltspunkte dafür bieten ; denn ein hypotoner Diuresezuwachs setzt zumindest eine eingeschränkte Wasserpermeabilität der distalen Abschnitte des Nephrons voraus.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurde die Wirkung der Diuretika Furosemid, Äthacrynsäure und - zum Vergleich - Salyrgan auf Kurzschlußstrom und Potentialdifferenz der isolierten Haut von Bufo bufo untersucht . Als Methode diente das Kurzschlußstromsystem von USSING und ZERAHN (1951). Es ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse bei Innen- und Außenzugabe.

1. S a l y r g a n wirkte lediglich bei Zugabe auf der Innenseite und führte in Abhängigkeit von der Dosis zu einer unterschiedlich schnellen Verminderung von Kurzschlußstrom und Potentialdifferenz.
2. F u r o s e m i d erhöhte bei Außenzugabe nur die Potentialdifferenz. Bei Innenzugabe kam es lediglich zu einem Abfall des Kurzschlußstromes.
3. Ä t h a c r y n s ä u r e bewirkte bei Innenzugabe eine allmähliche und unterschiedlich starke, bei Außenzugabe eine

Benzugabe eine schnelle und anhaltende Steigerung von Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom.

Bei der Interpretation der Untersuchungsergebnisse wurde davon ausgegangen, daß die bekannte Beziehung -Kurzschlußstrom = Nettotransport von Natrium - auch unter Einwirkung der genannten Diuretika Gültigkeit besitzt . Unter dieser Voraussetzung gestatten die Untersuchungsergebnisse die Feststellung, daß Furosemid und Äthacrynsäure nicht nur den aktiven Natriumtransport, sondern auch die Permeabilität für die passive Ionenbewegung beeinflussen.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

ANDERSEN, B., USSING, H.H. : Solvent drag on non electrolytes during osmotic flow through isolated toad skin and its response to antidiuretic hormone. Acta Physiol. Scand. 39, 228 (1952)

BAER, J.E., RUSSO, H.F., MICHAELSON, J.K. und BEYER, K.H.: A new class of diuretic-saluretic agents, the α, β -unsaturated ketone derivatives of aryloxyacetic acids. Pharmacologist 4, 158 (1962)

BEYER, K.H., BAER, J.E., MICHAELSON, J.K. und RUSSO, H.F.: Renotropic characteristics of ethacrynic acid. A phenoxyacetic saluretic-diuretic agent. J. Pharmacol. Exp. Ther. 147, 1 (1965)

BOURKE, E., COUNIHAN, T.B., KEELAN, P. und RYAN, M.: Clinical trial of a new diuretic: ethacrynic acid. J. Irish Med. Ass. 56, 1 (1965)

BUCHBORN, E. und ANASTASAKIS, S.: Angriffspunkt und Wirkungsmechanismus von Furosemid am distalen Nephron des Menschen. Klin. Wschr. 42. Jg., Nr. 22, 1127 (1964)

CAFRUNY, R.J.: Diuretics in clinical practice. Postgrad. Med. 35, 246 (1964)

CANNON, P.J., AMES, R.P. und LARAGH, J.H.: Methylenebutyryl phenoxyacetic acid. Novel and potent natriuretic and diuretic agent. J. Amer. Med. Ass. 185, 854 (1963)

CANNON, P.J., HEINEMANN, H., STASON, R.B. und LARAGH, J.H.: Ethacrynic acid. Effectiveness and mode of diuretic action in man. Circulation 31, 5 (1965)

CRABBE: Stimulation of active sodium transport by isolated toad bladder with aldosteron in vitro. J. clin. Invest. 40, Nr. 2, 2103 (1961)

DEETJEN, P.: Mikropunktionsuntersuchungen zur Wirkung von Furosemid. Pflügers Arch. ges. Physiol. 284, 184 (1965)

DU BOIS REYMOND, F.: Untersuchungen über tierische Elektrizität. Berlin 1848

FOLTZ, E.L.: Preliminary clinical observations with an aryloxyacetic acid diuretic.
Fed. Proc. 22, 598 (1963)

FUHRMANN, F.A.: Inhibition of active sodium transport in the isolated frog skin.
Amer. J. Physiol. 171, 266 (1952)

FUHRMANN, F.A. und USSING, H.H.: J. Cell.Comp.Physiol. 38, 109 (1951)

FUHRMANN, F.A. und USSING, H.H.: Fed. Proc. 9, 46 (1950)

GALEOTTI, G.: Concerning the EMF which is generated at the surface of animal membranes on contact with different electrolytes.
Z. Physic. Chem. 49, 542 (1904)

GOLDBERG, M., MC CURDY, D.K., FOLTZ, E.L. und BLUEMLE, L.W.: Effects of ethacrynic acid (a new saluretic agent) on renal diluting and concentrating mechanisms: evidence for site of action in the loop of Henle.
J. clin. Invest. 43, 201 (1964)

HEIDLAND, A., KLUTSCH, K., SUZUKI, F.: Nierenhämodynamik , Wasser- und Elektrolytausscheidung nach Furosemid.
Arzneimittel-Forschg. 14, Nr. 6, 713 (1964)

HERMS, W. und HOFFMANN, K.E.: Untersuchungen an der Froschhaut zur Kenntnis des Wirkungsmechanismus von Diuretica an transportaktiven Membranen.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmak. 251, 355 (1965)

HERRMANN, G.R. : Suspected refractory congestive heart failure.
Geriatrics 18, 578 (1963)

HILTON, J.G. und KESSLER, E. : Toxic reactions to ethacrynic acid, a new oral diuretic.
J. New Drugs 4, 93 (1964)

HOFMANN, G.: Die Diuresebehandlung der Schlafmittelvergiftungen.
Wien. med. Wschr. 115, Nr. 50, 1053 (1965)

HOOK, I.B. und WILLIAMSON, H.F.: Effect of furosemid on renal medullary sodium gradient.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 118, Nr. 2, 372 (1965)

HUF, E.G.: Versuche über den Zusammenhang zwischen Stoffwechsel , Potentialbildung und Funktion der Froschhaut.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 235, 655 (1935)

HUF, E.G. : Ion transport and ion exchange in frog skin. Aus: Electrolytes in biol. g. systems. Ed. M.M. Skanes
Amerc. Physiol. Soc. Washington D.C. (1953)

HUF, E.G., DOSS, N.S. und WILLS, J.P.: Effects of metabolic inhibitors and drugs on ion transport and oxygen consumption in isolated frog skin.
J. Gen. Physiol. 41, 397 (1957)

JAHNECKE, J., KONIETZKO, H. und KRÜCK, F.: Klinische Pharmakologie des Furosemid im akuten Versuch.
Sonderdr. d. Dtsch. Ges. Inn. Med. 70, 1001 (1964)

KARGER, W. und KRAUSE, D.: Der Einfluß von Temperaturstörungen auf Potential und Kurzschlußstrom der isolierten Froschhaut bei Anwendung impenetrabler Anionen.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 274, 340 (1962)

KARGER, W.: Oszillatorische Phänomene des elektrischen Potentials an der isolierten Froschhaut nach Temperaturwechsel.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 274, 331 (1962)

KAYSER, D.: Klinische Erfahrungen mit einem neuen, oral wirksamen Diureticum (Aethacrynsäure).
Arzneimittel-Forsch. 14, 949 (1964)

KIESSLING, J. : Praktische Erfahrungen mit Lasix, einem neuen Saluretikum.
Münch. med. Wschr. 107, Nr. 2, 95 (1965)

KIRCHNER, L.B.; J. Cell. Comp. Physiol. 45, 89 (1955)

KLEINFELDER, H.: Experimentelle Untersuchungen und klinische Erfahrungen mit einem neuen Diureticum.
Dtsch. med. Wschr. 88, Nr. 35, 1695 (1963)

KLÜTSCH, K., HEIDLAND, A. und SUZUKI, F.: Cambiamenti comparativi nelle clearance dell'aqua libera dapo somministrazione di Idroclorotiazide, Politiazide e Furosemid.
Atti Accad. Med. Lombarda 18, 1255 (1963)

KOEFOED-JOHNSON, C. und USSING, H.H.: The nature of frog skin potential.
Acta Physiol. Scand. 42, 298 (1958)

KOEFOED-JOHNSON, C., USSING, H.H. und LEVI, H. : Mode of passage of chlorid ions through the isolated frog skin.
Acta Physiol. Scand. 25, 150 (1951)

KOEFOED-JOHNSON, C.: The effect of g-strophantin on the active transport of sodium through the isolated frog skin.
Acta Physiol. Scand. 42 suppl. 145, 87 (1957)

LARIZZA, P., BRUNETTI, P., NENCY, G. und COLI, C.: Klinische Erfahrungen mit dem neuen Diureticum Furosemid.
Med. Klin. 59, Nr. 32, 1284 (1964)

LEAF, A., ANDERSON, J. und PAGE, L.B.: Active sodium transport through the isolated toad bladder.
J. Gen. Physiol. 41, Nr. 4, 657 (1958)

LEAF, A. und HAYS, R.M.: The effect of neurohypophyseal hormone on permeability and transport in a living membrane.
Recent Prog. in Horm. Res. Vol. 17 (1961)

LEDERBOGEN, K. und HÜDEPOHL, M.: Erfahrungen mit Furosemid (lasix) bei Ödemen verschiedener Genese.
Med. Welt, Nr. 3, 182 (1965)

LEDINGHAM, J.H.G.: Ethacrynic acid parenterally in the treatment and prevention of pulmonary oedema.
Lancet I, 952 (1964)

LINDERHOLM, H.: The frog skin as a model of kidney tubules for studies of active transport of ions and the action of diuretics.
Aus: Nierensymposion, Göttingen (1959)

LINDERHOLM, H.: "Sodium pump" in relation to sodium-concentration on the epithelial side.
Acta Physiol. Scand. 31, 36 (1954)

LINDERHOLM, H.: The electrical potential across isolated frog skin and its dependence on the permeability of the skin to chlorid ions.
Acta Physiol. Scand. 28, 211 (1953)

MAC GAFFEY, K., LE ZOTTE, L.A., SNYDER, J.H., MOORE, E.W. und JICK, H.: Ethacrynic acid. A new drug which abolishes the concentrating ability of the kidney.
Proc. Soc. Biol. (N.Y.) 116, 11 (1964)

MAHER, J.F., O'CONNELL, J.M.B., SETTER, J.G. und SCHREINER, G.E.: Effect of ethacrynic acid on refractory edema.
Clin. Res. 12, 70 (1964)

MAHER, J.F. und SCHREINER, G.E.: Studies on ethacrynic acid in patients with refractory edema.
Ann. Int. Med. 62, 15 (1965)

MELVIN, K.E.W., FARRELLY, R.O. und NORTH, J.D.K. :
Ethacrynic acid. A new oral diuretic.
Brit. Med. J. 1, 1521 (1963)

MEYER, K.H., BERNFELD, P.: The potentiometric analysis of membrane structure and its application to living animal membranes.
J. Gen. Physiol. 29, 353 (1946)

MOLL, H.Ch.: Kaliummangel.
Münch. med. Wschr. 107, Nr. 17, 839 (1965)

MOTOKAWA, K.: 1. Studien über die EMK der toten Froschhaut vom kolloidchemischen Standpunkte aus .
2. Mitteilung: Über den zeitlichen Verlauf der EMK der toten Froschhaut und den Zusammenhang der Potentialdifferenz mit anderen kolloidchemischen Eigenschaften.
Jap. J. Med. Sc. Biophys. 3, 95 (1935/36)

MÜLLER, P. und SCHAUB, R.: Experimentelle und klinische Untersuchungen mit Ethacrynsäure, einem chemisch neuartigen Diureticum.
Klin. Wschr. 42, 958 (1964)

MUSCHAWECK, R. und HAJDU, P.: Die saluretische Wirksamkeit von Furosemid.
Arzneimittel-Forsch. 14, 44 (1964)

NAGEL, W. und KARGER, W.: Die Wirkung von 4-Chloro-N-(2-furylmethyl)-5-sulfamoyl-anthranilsäure (La - six) auf ionenaktive Membranen.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 281, Nr. 1, 63 (1964)

PECK, H.M., MAC KINNEY, S.E. und ZWICKEY, R.E.: The toxicologic evaluation of ethacrynic acid (MK-595).
Fed. Proc. 23, 438 (1964)

PUPITA, F., BARTOLI, E., MOLASCHI, M., BERT, G., DESSY, M. und MIGHELI, B.: Ricerche sperimentali sul meccanismo d'azione e sugli effetti metabolici del furosemide.
Clin. Ter. 30, Nr. 6, 709 (1964)

ROBSON, A.O., KERR, D.N.S., ASHCROFT, R. und TEASDALE, G.: The diuretic response to furosemide.
Lancet II, Nr. 7369, 1085 (1964)

SCHNEER, B.T. und MUMBACH, M.W. : The locus of the electromotoric force in frog skin.
J. Cell. Comp. Physiol. 55, 259 (1960)

SCHULER, F., QUELLHORST, E. und HÖFFLER, D. : Über die Anwendung von Furosemid bei eingeschränkter Nierenfunktion.
Med. Welt, Nr. 51, 2849 (1965)

SCHIRMEISTER, J. und WILLMANN, H. : Über die Harnsäure- und andere Clearances nach intravenöser Gabe von Furosemid beim Menschen.
Klin. Wschr. 42, Nr. 13, 623 (1964)

SCHNITZLER, R. und FRITZ, K.W. : Eine vergleichende klinische Prüfung des Diuretikums Furosemid.
Arzneimittel-Forsch. 16, Nr. 5, 630 (1965)

SCHOFFENIELS: Arch. Int. Physiol. 63, 513 (1955)

STOKES, W. und NUNN, L.C.A. : A new effective diuretic - Lasix
Brit. Med. J. 2, Nr. 541, 910 (1964)

SUZUKI, F., KLÜTSCH, K. und HEIDLAND, A. : Stop-flow-Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Furosemid.
Klin. Wschr. 42, Nr. 12, 569 (1964)

TIMMERMANN, R.J., SPRINGHAM, F.R. und THOMS, R.K. : Beurteilung von Furosemid, einem neuen Diuretikum.
Curr. Ther. Res. 6, Nr. 2, 88 (1964)

UHLENBROCK, P. : Über bioelektrische Ströme an der Froschhaut.
Z. Biol. 82, 225 (1925)

USSING, H.H. : The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies.
Acta Physiol. Scand. 17, 1 (1949)

USSING, H.H. : The alkali metal ions in biology.
Handbuch exp. Pharm., 122, Berlin (1964)

USSING, H.H. : The distinction by means of tracers between active transport and diffusion. The transfer of iodide across the isolated frog skin.
Acta Physiol. Scand. 49, 19 (1943)

USSING, H.H. und ZERAHN, K. : Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.
Acta Physiol. Scand. 23, 110 (1951)

VORBURGER, C. : Un nouveau diurétique, le Furosemid.
Rev. Méd. Suisse rom. 84, Nr. 4, 277 (1964)

VORBURGER, C. : Die akute Wirkung des Diuretikums Furosemid auf das Glomerulumfiltrat , die renale Hydrodynamik, die Wasser-, Chlor- und Kaliumausscheidung und der Sauerstoffverbrauch der Nieren. Klin. Wschr. 42, 833 (1964)

WALLNÖFER, H. und HANUSCH, M.: Über den Einsatz neuerartiger Saluretika in der Ödembehandlung. D. prakt. Arzt, 19. Jg., Nr. 223, 852 (1965)

WÖLFER, H. J., SCHNEIDER, K. W., GATTENLÖHNER, W. und GÜNTHER, J.: Behandlung der arteriellen Hypertonie mit Furosemid. Münch. med. Wschr. 106, Nr. 40, 1767 (1964)

L e b e n s l a u f

- 7.11.1939 Geburt in Wiesbaden als Sohn des Arztes Dr. med. Dieter Carl und seiner Ehefrau Dr. med. Hilde Carl, geb. Astor.
- 1945 Einschulung in Utting / Ammersee.
- 1949 Besuch der mathematisch - naturwissenschaftlichen Gymnasien in Landsberg/Lech, ab 1952 in München-Fasing und ab 1956 in Wilhelmshaven.
- 1959 Abitur am Max - Planck - Gymnasium in Wilhelmshaven.
- 1961 Nach Ableistung der Wehrpflicht bei der Bundesmarine Beginn des Medizinstudiums an der Universität Freiburg ; dort 1962 naturwissenschaftliche und 1963 ärztliche Vorprüfung.
- 1964 Klinisches Studium an der Universität München, wo mir das Thema meiner Dissertation überlassen wurde . Nach 4 Semestern Wechsel zur Universität Hamburg.
- Jan. 1967 Ärztliche Prüfung an der Universität Hamburg.
- Febr. 1967 Beginn der Medizinalassistentenzeit : 7 Monate auf der inneren Abteilung der Städt. Krankenanstalten in Wilhelmshaven und 4 Monate auf der chirurgischen Abteilung des Nordstadtkrankenhauses in Hannover.

